

Angiotensin II 受容体作動薬及び拮抗薬がモルモット肺静脈心筋自発活動に与える影響

○田中悠介、入江雅彦、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
東邦大学薬学部薬物学教室

肺静脈は肺から心臓に血液を運ぶ血管であるが、隣接する左心房から連続する心筋層を有している。この肺静脈に存在する心筋、即ち肺静脈心筋は自動能を持ち、心房細動 (Af) の主要な発生源となることが示されている。モルモットから摘出した肺静脈標本は一定確率で自発的な拍動 (自発活動) を起こしており、当研究室ではその発生メカニズムを検討してきた。今回着目したAngiotensin II (Ang II) は血管収縮性の内因性ペプチドであり、慢性的な増加は心臓負荷を増大し、リモデリングを促進することでAfの発生に関与する。実際、AT₁受容体拮抗薬の持続的な処置がAfの発症を抑制することが報告されている。しかしながら、Afの発生源となる肺静脈心筋へのAng IIの急性作用には不明な点が多く、それを解明することを目的として肺静脈心筋の活動電位を取得、薬物処置前後の自発活動の頻度や活動電位波形の変化を解析した。自発活動が発生していない肺静脈標本にAng IIを処置した所、自発活動の発生は誘発されなかったが、自発活動が発生している標本にAng IIを処置するとその発生頻度が増大した。AT₁受容体拮抗薬であるLosartanはAng II処置の有無に関わらず自発活動を抑制した。AT₂受容体拮抗薬であるPD 123319を前処置した後にAng IIを処置すると自発活動を発生していない一部の標本で自発活動の誘発が確認され、既に自発活動が発生している標本に同様の処置を行った場合、Ang IIによる自発活動発生頻度の増大が増強された。これらの結果から、Ang II単独処置が肺静脈心筋の自発活動に促進的に働くこと、Ang IIによるAT₁受容体刺激が自発活動に促進的に働く一方で、AT₂受容体刺激は自発活動に抑制的に働くことが示唆された。また、LosartanがAng II未処置でも自発活動を抑制したことから、内因性のAng IIが自発活動に関与している可能性が考えられる。今後はこれらの作用がどのようなメカニズムで起こるのかを追求するとともに、他のRenin-angiotensin系に作用する薬物を用いた検討も行っていきたい。

The molecular mechanism by which PDGF activates $Ca_v1.2$ channels in vascular smooth muscle cells

Xiaoguang Guo, Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiko Yamada
Dept. Mol. Pharmacol., Shinshu Univ. Sch. Med., Matsumoto, Japan

In atherosclerosis, platelet-derived growth factor (PDGF) predisposes abnormal vasoconstriction, but its mechanism remains unclear. Calcium influx through $Ca_v1.2$ L-type Ca^{2+} channels plays a crucial role in contraction of vascular smooth muscle cells (VSMC). Here, we investigated the effect of the chronic exposure of VSMC to PDGF on $Ca_v1.2$ channels by using a rat aortic smooth muscle cell line, A7r5. A7r5 cells were stimulated with vehicle or PDGF-BB (10 ng/ml) for 24 hours. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured with fluo-4, and LTCC currents were measured with the whole-cell patch-clamp method. Extracellular 60 mM K^+ solution increased $[Ca^{2+}]_i$ significantly more strongly in PDGF-treated than control cells. This effect was inhibited by a Src/Abl inhibitor, bosutinib (2 μ M) but not a protein kinase C inhibitor, Go6983 (0.5 μ M). As assessed with immunoblot, PDGF did not alter α_{1C} subunit expression; however, it significantly increased LTCC current amplitude by ~ 1.5 fold between -30 and +50 mV. This effect of PDGF on LTCC currents was completely inhibited by overexpression of C-terminal Src kinase, an endogenous inhibitor of Src-family tyrosine kinases (SFK). Overexpression of c-Src significantly increased the activity of a recombinant full-length smooth muscle type of $Ca_v1.2$ channels but not that of the C-terminally truncated $Ca_v1.2\Delta 1763$ channel with or without coexpression of its distal C-terminus in tsA201 cells. Immunoblot revealed that most $Ca_v1.2$ channels exist as a full-length form in A7r5 cells. These results suggest that PDGF causes functional upregulation of full-length $Ca_v1.2$ channels through SFK in VSMC.

Goto-Kakizaki rat尾動脈交感神経からのノルエピネフリン遊離作用に対するアンギオテンシンⅡの作用

○小石川 衛、野澤(石井) 玲子、加賀谷 肇

明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】Wistarラットを起源とするGoto-Kakizaki (GK) ラットは、非肥満、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性という特徴を併せ持つ日本人の2型糖尿病に近いモデル動物である。糖尿病性神経障害は糖尿病患者における重大な合併症の一つである。その中でも自律神経障害は、発汗異常、起立性低血圧など起こし、患者のQOL低下に大きくかかわっている。しかし、心血管系自律神経機能障害はその進行が心血管系イベントの発症にきわめて重要であるにもかかわらず、知覚神経障害に比べてそれ自体による症状が乏しいため、見過ごされることが多い。そこで交感神経障害の病態を明らかにするために、2型糖尿病モデル動物を用いて検討することにした。当研究室ではすでに、GKラット尾動脈交感神経において、神経側にある受容体を介した反応性の低下を報告している。今回は、GKラットを用いて、電気刺激 (ES) によるノルエピネフリン (NE) 遊離作用に対するアンギオテンシンⅡ (AngII)、およびPPAR- γ アゴニストであるピオグリタゾン (Pio) の影響について検討した。

【方法】12週齢のWistarおよびGKラットから尾動脈を摘出した。尾動脈標本は白金電極に装着し、栄養液中で30分ごとに3分間のES (1Hz、50V) を2回行った。栄養液中に放出されたNEは、アルミナにより抽出し、HPLC-電気化学検出器により測定した。

【結果および考察】AngIIはシナプス前AT1受容体に作用して、NE遊離を促進的に調節しており、GKラットではAngIIによりNEの遊離が促進された。PioはNE遊離に対して影響を示さなかったが、AngIIによるNE遊離促進作用を抑制する傾向が見られた。一方、WistarラットではAngIIによってもPioによっても顕著な効果が見られなかった。

Goto-Kakizaki ratの大動脈からのヒドロキシラジカル発生作用とNO遊離作用に対するエンドセリン-3の影響

○丸茂 圭太郎、野澤(石井)玲子、加賀谷 肇

明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】血管内皮におけるNOの生物学的活性の低下や酸化ストレスは、様々な経路を介し、糖尿病性血管障害の発症や進展に深く関与している。我々は第132回日本薬理学会関東部会において、血管内皮細胞由来の血管収縮ペプチドであるエンドセリン-1 (ET-1) が2型糖尿病モデルラットであるGoto-Kakizaki (GK) ラット大動脈からのヒドロキシラジカル発生作用を増強させることを報告している。今回、ET-1とは受容体親和性が異なるエンドセリン-3 (ET-3) を用いて、GKラット大動脈からのNO遊離作用とヒドロキシラジカル発生作用について、正常血糖値のWistarラットと比較検討した。

【方法】12週齢のWistarおよびGKラットから大動脈を摘出した。血管標本は、Krebs液で洗浄後、30 mMの4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA) を添加したKrebs液中で、薬物を30分作用させた。4-HBAは、ヒドロキシラジカルをトラップすることにより3,4-Dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA) を生成する。Krebs液中の3,4-DHBAはHPLC-電気化学検出器で、NOはGiese法を応用したHPLC法で測定した。

【結果】Wistarラットと比較してGKラットでは自発的なヒドロキシラジカル発生作用が増強する傾向がみられた。GKラットにおいて、ET-3 (10^{-8} M) はヒドロキシラジカル発生作用を抑制し、ET-3 (10^{-6} M) はNO遊離作用を有意に促進した。

【考察】以上の結果から、Wistarラットでは、ET-3によってNO遊離作用やヒドロキシラジカルの発生作用に顕著な影響は見られなかった。一方、GKラットでは、ET-3によってヒドロキシラジカルの発生が抑制され、NO遊離作用が促進されたことから、ET-1と異なり血管を保護する可能性が示唆された。

P-5

マウスの耐糖能及び腸間膜動脈血管機能に及ぼす運動トレーニングの効果

○伊藤政明、小島卓也、松岡 功

(高崎健康福祉大・薬・薬効解析)

糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病は、動脈硬化に起因する心筋梗塞や脳梗塞、腎障害などを引き起こす。その根底には血管内皮機能障害が想定されている。有酸素運動はこれら生活習慣病の基本治療であるだけでなく、健康の維持・増進として推奨されていることは周知の事実である。しかしその有益な効果の機構は、諸説唱えられているものの実態は明らかではない。本研究では、運動トレーニングの有益性の機構を探るべく、まずは正常動物の耐糖能および血管機能を指標として運動負荷の影響を検討した。

マウスへの運動負荷は、回転かご式自発運動量測定装置を用いて3週間行った。一日当たり自発的に7~8km走行した。体重や随時血糖値は、運動負荷の有無により大きな影響を受けなかった。しかしながら、糖負荷試験を行ったところ、運動負荷3週目において、非運動群に対して耐糖能が有意に向上した。血管機能は抵抗血管のモデルである腸間膜動脈の灌流により評価した。その結果、ノルアドレナリン (NA) の血管収縮作用に基づく灌流圧の上昇は、運動負荷の有無により差を認めなかった。一方、NAによる灌流圧上昇に対するアセチルコリンの血管拡張応答は、運動負荷群で有意に向上していた。また、アデノシン三リン酸 (ATP) をはじめとする細胞外ヌクレオチドは、血管のずり応力等により血中に放出され特異的な受容体を介して血管機能を調節することが報告されている。ATPはNAによる血管収縮に対して拡張応答を示したが、その作用は運動群マウスで有意に亢進していた。さらに、ATPおよびUDPは血管収縮応答も示したが、運動の有無による差は認められなかった。

以上の結果から、正常動物においても運動負荷により耐糖能および血管弛緩機能の向上が認められ、運動トレーニングによる健康維持・増進作用を確認できた。今後は、本モデルを詳細に解析するとともに高血糖や肥満などの病態モデル動物を用いた運動トレーニングの効果を検討していきたい。

P-6

血管内皮細胞における小胞体カルシウム放出とカルモジュリンによるNADPHオキシダーゼ由来の活性酸素種生成の調節機構

○小田切圭一^{1,2}、袴田晃央¹、神谷千明¹、乾直輝¹、渡邊裕司¹

¹浜松医科大学医学部 臨床薬理学講座 ²浜松医科大学医学部附属病院臨床研究管理センター

背景:今までにカルシウム/カルモジュリン ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) がNADPHオキシダーゼ (NOX) を活性化することが報告されている。血管内皮細胞におけるカルシウム応答はストア調節性カルシウムイオン流入 (SOCE) により調節されている。SOCEは小胞体における Ca^{2+} 放出と引き続き生じる Ca^{2+} チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入の2つのコンポーネントにより構成されるが、いずれのコンポーネントが $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ によるNOXの活性化に寄与するかは明らかではない。

目的:本研究の目的は小胞体からの Ca^{2+} の放出とNOX由来の活性酸素種 (ROS) 生成の関連性を明らかにすることである。

方法:初代培養豚大動脈内皮細胞を用いて、ブラジキニン (BK: $1\ \mu\text{M}$) 刺激によるROSの産生について、ROS感受性蛍光色素 (C-DCDHF-DA) を用いて検討した。

結果: (1) BKの投与により、C-DCDHF-DAの蛍光強度は速やかに上昇を認め、活性酸素種のスカベンジャーであるTrolox (10mM) の前投与により抑制された。この反応はブラジキニンB2受容体阻害薬であるHOE-140 ($1\ \mu\text{M}$) の前投与により抑制された。

(2) BKによるROS生成はNOX阻害薬であるVAS2870の前投与により抑制された。

(3) 細胞外カルシウム濃度を1mMおよび0mM (EGTA:1mM) の条件下でBKによるROS生成反応を比較した時、両群間で差を認めなかった。

(4) 細胞外カルシウム濃度0mMの条件下において、BKによるROS生成は、BAPTA ($100\ \mu\text{M}$) あるいはタプシガルギン ($1\ \mu\text{M}$) の前投与で完全に抑制された。

(5) CaM阻害薬 (W-7: $100\ \mu\text{M}$) の前投与によりBKによるROS生成は完全に抑制された。

結語:豚大動脈血管内皮細胞における $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ によるNOX由来のROS生成は、小胞体からのカルシウム放出により調節を受けることが明らかとなった。

エキソソーム様小胞封入GLP-2の経鼻投与による抗うつ様作用

○秋元俊希¹、濱田幸恵^{1,4,5}、伊豫田拓也^{2,4}、梅澤雅和³、岡淳一郎^{1,4}

¹東京理科大 薬 薬理、²分子病態、³基礎工 材料、⁴総研院 TRセンター、⁵北里大 医療衛生 生理

【背景・目的】 Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) は、腸管や脳でプログルカゴンから産生されるアミノ酸33個からなるペプチドで、我々は、側脳室内投与により治療抵抗性うつ病モデルマウスで抗うつ様作用を示すことを報告した。側脳室内投与法は臨床では使用できないため、我々は、経鼻投与法をもちいて中枢移行させることを目的として、これに適したGLP-2誘導体を作製し、その中枢移行性と抗うつ様作用について報告している。本研究では、経鼻投与で中枢移行させることが報告されている別の方法として、植物由来エキソソーム様小胞にGLP-2を封入した経鼻投与剤を作製し、抗うつ様作用の発現について検討した。

【方法】 オニオン (*Allium cepa*) は皮をむき-20°Cで保存し、凍結させたまますり潰した液を遠心分離した。上清を口径450 nmのフィルターに通した後、Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Sci.) を用いてオニオン由来小胞を抽出した。ここにGLP-2または蛍光色素ICGをC末に付加したGLP-2をエレクトロポレーションにより導入した。PBSまたはDMSOで希釈し、ddY系雄性マウス (5-6週齢) の鼻腔内に、方鼻3.6 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ (全量7.2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を2日間投与した。抗うつ様作用は、強制水泳試験 (FST) を用いて5分間における無動時間で評価した。

【結果・考察】 エキソソーム様小胞封入GLP-2及びICG付加GLP-2は、FSTの無動時間を短縮させ、抗うつ様作用を示した。ICG付加GLP-2の経鼻投与30分後に灌流固定を行い、脳凍結切片 (30 μm) を作製して蛍光分布を観察中である。また、使用したICG付加GLP-2のエキソソーム様小胞内包埋率を計測中である。

【結論】 これまでに種々の細胞からエキソソーム様小胞を回収して調べた結果、今回用いたオニオン由来の小胞が、経鼻投与後に封入体を効率良く中枢移行させることを見出している。GLP-2も本エキソソーム様小胞に封入することにより、包埋率は現在不明であるが側脳室内投与 (3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) と類似した投与量で抗うつ様作用を示すことが明らかとなり、今後の臨床応用に重要な製剤化の技術基盤となることが示された。

吃逆に対する柿蒂湯の効果 ～柿蒂トリテルペノイドの抗けいれん作用の検討～

○石川 知穂¹、竹内 万純¹、上村 紗英¹、野澤(石井)玲子¹、福田枝里子²、馬場正樹²、岡田嘉仁²、加賀谷 肇¹

¹明治薬科大学 臨床薬剤学教室、²天然薬物学教室

【目的】がん患者においては、化学療法の施行期や終末期にしゃっくり（吃逆）の症状を呈する患者が散見される。吃逆は横隔膜のけいれんで、一般的にメジャーランキライザーや抗けいれん作用のあるベンゾジアゼピン系の薬物が使用されているが著効を示す薬剤は少ない。一方古くから吃逆に用いられてきた柿蒂湯は、柿蒂、生姜および丁字の3種の生薬から構成される漢方処方である。柿蒂湯の構成生薬の一つである柿蒂の煎じ液を吃逆の治療に用いる施設もあり、また全身性ミオクローヌスに有効であるという報告もなされている。そこで我々は、柿蒂は抗けいれん薬としての作用を有するのではないかと考え、薬物により誘発されるけいれんに及ぼす影響を検討し、柿蒂の水エキス、メタノールエキス、酢酸エチルエキスの各エキスにも抗けいれん作用が認められることを報告している。そこで今回、より吃逆に効果的な成分を探索することを目的に、柿蒂酢酸エチルエキス分画およびその成分である柿蒂に含まれるリテルペノイドの抗けいれん作用について検討した。

【方法】柿蒂を酢酸エチルで抽出し、オープンカラムで分画した。分画は脂溶性の高い順に作成した。マウスに柿蒂酢酸エチルエキス分画サンプルまたは柿蒂トリテルペノイドの混合物を経口投与後、ストリキニーネまたはピクロトキシンをそれぞれ腹腔内投与し、間代性けいれん開始時間、強直性けいれん開始時間、死亡までの時間を計測した。

【結果および考察】酢酸エチルエキス分画サンプルは、ストリキニーネ誘発けいれんに対して、けいれん開始時間や死亡までの時間を延長させた。柿蒂トリテルペノイド単品より混合物に抗けいれん作用が認められた。以上の結果より、柿蒂の酢酸エチルエキス分画成分には、ストリキニーネけいれん誘発までの過程に対して作用することが示された。柿蒂トリテルペノイドの作用時間や高濃度をさらに検討する必要がある。

カラゲニン処置ラットの脊髄後根神経節由来の神経細胞にKClが誘発した細胞内Ca²⁺量の増加に対するorexin-Aの抑制効果

○石川 学¹、青野 悠里²、木村 全孝³、鈴木亜沙子³、卯田 昭夫¹、
河相 安彦³、久保山 昇²、渋谷 鑛¹、三枝 禎²

日本大学松戸歯学部¹歯科麻酔学講座、²薬理学講座、³有床義歯補綴学講座

Orexin-Aの髄腔内投与は、実験動物で抗侵害効果を示す (Yamamoto et al., 2003)。しかし侵害刺激下の個体の感覚神経に対するorexin-Aの作用の詳細は細胞レベルでは明らかでない。そこで本研究では起炎物質のカラゲニンを後肢足底へ投与したラットを用い、同部位の圧刺激からの回避閾値 (paw withdrawal threshold: PWT) を解析したのち、この個体の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) からC線維と想定される小型神経細胞を分離した。つぎにこの神経細胞へのKCl刺激による細胞内Ca²⁺量 ([Ca²⁺]_i) の増加に対するorexin-Aの作用におけるorexin受容体サブタイプの役割について、OX₁とOX₂受容体拮抗薬のMK-4305とOX₁受容体拮抗薬のSB 334867を用いて検討した。

実験には約10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。対照群にはsaline、処置群には2% カラゲニンを含むsalineを両後肢足底へそれぞれ0.25 ml皮下投与した。これらの投与の直前から投与後7日まで24時間毎に、後肢足底へのvon Frey filamentによる刺激からの回避を起こす閾値 (g) を測定しPWTとした。炭酸ガスで安楽死させた個体のDRGより分離した神経細胞は細胞接着剤のCell Takで観察用容器に接着固定し、Ca²⁺蛍光指示薬のFluo-4/AMを負荷した。KCl (25 mM) 処置による直径約20 μmの神経細胞内のFluo-4の蛍光強度の変化を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。薬物は少量のDMSOを含む超純水に溶解し観察用容器に滴下した。KClを除く使用薬物の用量は観察用容器 (2 ml) における絶対量 (pmol) で示した。

その結果、基礎的なPWTは対照群、処置群とも26 gだった。対照群と異なり処置群は処置後7日にわたりPWTが約10 gまで低下した。処置後1日の個体のDRG由来の神経細胞の蛍光強度は、KCl刺激で対照群、処置群とも約2.1倍増加した。基礎蛍光強度を変化させない用量のorexin-A (20 pmol) の併用でKClによる蛍光強度の増加は、対照群には影響が見られなかったが処置群は約1.3倍に減弱した。この蛍光強度の増大のorexin-Aによる抑制はMK-4305 (200 pmol) で消失したがSB 334867 (2 pmol) の影響は認められなかった。

以上の結果から、対照群および処置群のDRG由来の神経細胞の[Ca²⁺]_iはKCl刺激により同程度増大することが示された。またカラゲニン処置によりPWTが低下した個体のDRGの神経細胞にKClが誘発した[Ca²⁺]_iの増加を、orexin-AはOX₁ではなくOX₂受容体刺激を介して抑制することが示唆された。

ナノサイズシリカ粒子による神経細胞への影響

○山名智人(1)、上窪裕二(1)、井上由理子(2)、櫻井隆(1)

(1)順天堂大学・医学部・薬理学講座 (2)昭和大学・医学部・解剖学講座 肉眼解剖学部門

【背景・目的】 ナノテクノロジーの発展に伴い、様々な素材、サイズ、形状のナノ粒子が作成され、食品、化粧品、工業用などの方面で利用されている。医療面においては、直径数十ナノメートルサイズのシリカ (SiO₂) 粒子は血液脳関門を通過することから、薬物や遺伝子のキャリアとしての利用が期待されている。一方で、ナノ粒子による細胞障害性、胎児の発達障害、アレルギー反応などが報告されており、環境・健康両面への影響が懸念されている。ナノ粒子の障害性については主に培養株化細胞を用いて評価されており、中枢神経系に対する作用はほとんど分かっていない。そこで私たちは、初代培養神経細胞を用いてナノシリカ粒子が神経細胞に与える影響について検討を行った。

【方法】 ラット海馬由来の初代培養神経細胞を用い、ナノシリカ粒子暴露による神経細胞障害性を検討した。ナノシリカ粒子は培地に添加し、一定時間後の細胞の内在性のATPを測定することで細胞障害性を評価した。細胞に対する酸化ストレスの誘導は活性酸素種を定量する蛍光プローブを用いて検出した。ナノシリカ粒子の局在および神経細胞の形態変化については、赤色蛍光ナノシリカ粒子の暴露とMAP2、GFAPの免疫染色によって評価した。

【結果・考察】 ナノシリカ粒子の暴露は、細胞内のATP量を低下させること、細胞内の活性酸素種を増加させること、神経突起を破壊することが確認された。さらに、ナノシリカ粒子の細胞障害性は粒子の表面積に依存することが明らかになった。以上の結果はナノシリカ粒子の神経細胞障害性を示すものであり、医療等に応用するためには、その細胞障害性を軽減させる方法を検討する必要がある。

クエン酸によるオロパタジン口腔内崩壊錠の苦味抑制効果

○外山真衣¹、内田信也¹、田中紫茉莉¹、袴田晃央²、小田切圭一²、乾直輝²、
渡邊裕司²、並木徳之¹

¹静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府実践薬学講座 ²浜松医科大学医学部臨床薬理学講座

【目的】不快な味の薬物を口腔内崩壊錠（ODT）とするためには、アドヒアランス低下を防ぐための苦味マスキングが必要とされる。食品や医薬品に利用されるクエン酸は一般に苦味を抑制することが知られているが、in vivoによる定量評価はほとんど行われていない。本研究では抗ヒスタミン薬のオロパタジン塩酸塩を用いて、ヒト味覚官能試験によりODTにおけるクエン酸の苦味抑制効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】錠剤重量の0、0.1、1.0、2.5、5.0及び10%のクエン酸を添加したオロパタジンODT（C0-, C0.1-, C1-, C2.5-, C5-, C10-ODT）を作製した。被検ODTを精製水100 mL中に溶解させ、電子味覚システムASTREE（アルファ・モス社製）による分析を行い、ユークリッド距離を算出した。また、溶液中の薬物濃度及びpHを測定した。さらに健康成人10名（平均22.9歳）を対象とした味覚官能試験において、被験者は錠剤を口腔内で崩壊させ visual analogue scale（VAS）を用いてODTの苦味（0:なし～100:たいへん苦い）を評価した。本試験は浜松医科大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

【結果・考察】被検ODTを溶解させた水溶液のオロパタジン塩酸塩濃度は40.9～43.5 µg/mL、pHは3.28～6.26を示した。またC0-, C0.1-, C1-, C2.5-, C5-及びC10-ODTのユークリッド距離はそれぞれ373、346、137、51、94及び34であり、味覚官能試験におけるODTの苦味VAS値はそれぞれ47、39、30、23、27及び20を示し、ODT中へのクエン酸添加量の増加に伴い、ODTのユークリッド距離及びVAS値は減少した。またODTのユークリッド距離とVAS値との間に有意な直線関係が認められた（ $r^2=0.922$, $p=0.0024$ ）。さらに、ユークリッド距離と各溶液のpHの間には有意な直線性（ $r^2=0.934$, $p=0.0017$ ）が認められたが、薬物濃度との間には有意な相関は認められなかった（ $r^2=0.528$, $p=0.102$ ）。以上、電子味覚システム及び味覚官能試験により、クエン酸は添加量依存的にオロパタジンODTの苦味を抑制することが示唆された。

マウス胚由来ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターの酵素活性検証のための線溶を利用した実験法の確立

○浅野有希子¹⁾ 岩城孝行²⁾ 梅村和夫²⁾ 金山尚裕¹⁾

¹⁾浜松医科大学産婦人科学教室 ²⁾浜松医科大学薬理学講座

【目的】ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター (uPA) は血栓溶解反応 (線溶反応) においてプラスミノゲンをプラスミンに活性化するセリン酵素である。マウスの着床においては受精後4日以降の胚盤胞の栄養外胚葉からuPAが分泌され直接的・間接的に子宮内膜の細胞外マトリックスを分解して子宮間質への浸潤に関与する。またマウス胚盤胞のuPA活性が線溶を誘起することも報告されている。着床に関与する胚由来uPAの酵素活性を *in vitro* で検討するため線溶を利用した実験系を確立したので報告する。【方法】ICRマウス凍結胚盤胞を融解し培養した。実験①胚盤胞のディッシュへの接着、増殖の検討: 凍結胚盤胞を融解後最大6日目まで培養し、フィブリン固相上とコラーゲン固相上の培養と比較した。実験②胚周辺のフィブリン溶解可視化の検討: 蛍光色素Alexa488でラベルしたフィブリノゲンを用いてフィブリンを作製・固相したディッシュ上で胚を培養し、細胞周辺の発色を欠く領域をフィブリン溶解面積として計測した。実験③胚由来uPAの線溶への関与の検証: uPA阻害薬であるBC11 hydrobromideとAmiloride hydrochloride hydrateを終濃度が各10、30、100 μ Mになるように培養液に加え、細胞面積と溶解面積を測定した。

【結果】実験①融解後2日目で胚はディッシュに接着、3日目以降に増殖した。フィブリン固相とコラーゲン固相でも差はなく発生した。実験②2日目接着時から細胞周辺に線溶が生じ始め、3から4日目にかけて溶解面積は約2.5倍に拡大した。融解時に細胞変性した胚周辺に線溶は見られなかった。実験③対象群に比べuPA阻害薬群の溶解面積は濃度依存的に抑制されたが、100 μ Mでは細胞増殖も抑制されたため10 μ Mが阻害実験に適していた。

【考察】蛍光フィブリンを利用した胚培養により経時的な線溶を可視化定量できた。またuPA阻害薬で線溶が抑制されたことから胚由来uPAが線溶に直接的に関与することを明らかにした。今後胚由来uPA酵素活性に着目した本実験法をヒト胚に適応させ種差の検討を行う予定であり、倫理面で試供数の少ないヒト胚でもuPA分泌量の推測が可能になった。

P-13

甘草含有成分の抗ヘルペスウイルス活性に対する定量的構造活性相関解析

植沢芳広¹、福地邦彦²、坂上宏²、加賀谷肇¹、大野裕和⁴、山本正次⁴

¹明治薬科大学、²昭和大学大学院、³明海大学歯学部、⁴丸善製薬

【緒言】我々は、甘草の含有成分であるフラボノイドおよびカルコン誘導体が示す抗腫瘍活性および腫瘍細胞に対する選択毒性について報告した（第86回日本薬理学会年会）。本研究では、これらの甘草中成分が示す抗ヘルペスウイルス活性に焦点を当て、定量的構造活性相関（QSAR）解析法により抗ウイルス活性に寄与する化学構造的特徴の抽出を試みた。

【方法】（1）選択係数（SI値）の評価：10種類の甘草含有フラボノイドおよびカルコン誘導体、5種類のポリメトキシフラボノイド、および4種類のポリフェノール類からなる合計19種類の被検化合物を本解析に使用した。MTTアッセイ法により、これらの化合物が単純ヘルペスウイルス（HSV-1）感染ベロ細胞および非感染ベロ細胞（mock）に及ぼす毒性を評価し、EC50値およびCC50値をそれぞれ求めた。さらに、各化合物のSI値（= CC50 / EC50）を算定した。なお、SI値は値が大きいほど抗ウイルス薬として優れていることを意味する。（2）QSAR解析：各化合物の化学構造に基づき、物理化学的特徴等を含む1705種類の分子構造記述子を算定し、各記述子と対数化SI値の間の相関を観察した。

【結果・考察】本研究の他の被検化合物と比較して、甘草含有成分には極めて高いSI値を示す化合物を認めた。特に、Liquiritin apioside, Isoliquiritin apioside, および LucurzidはSI値が400以上を示す優れた抗ヘルペスウイルス活性を示した。QSAR解析の結果、甘草含有成分を含む全ての被検化合物のSI値は、分子の極性、イオン化ポテンシャル、分子サイズおよび環構造数に関連する記述子と良好な相関を示すことが判明した（ $r^2 > 0.6$, $P < 0.0001$ ）。この結果は、これらの化合物の抗ヘルペスウイルス活性が構造的なカテゴリーを超越した構造的・物理化学的特徴に依存することを示唆している。以上の知見は、甘草の機能の解明のみならず、新規抗ウイルス薬の創製に有用な知見となるものと期待される。

P-14

持続的なアストロサイト性脳虚血耐性の分子メカニズム解析

○平山友里^{1,2}、小泉修一¹

¹山梨大院・医・薬理、²山梨大院・医・リエゾンアカデミー

脳虚血耐性とは、あらかじめ非侵襲的虚血 (Preconditioning; PC) を経験しておく、その後の侵襲的な虚血に対して抵抗性を示し、脳梗塞傷害が軽減する現象である。我々はこれまでに中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、PC後に活性化するアストロサイトが虚血耐性獲得に重要であること、その分子メカニズムとしてP2X7受容体/HIF-1 α 経路が関与していることを報告した。PC後のHIF-1 α 発現亢進は神経細胞とアストロサイトで認められるが、なぜ神経細胞由来のHIF-1 α ではなく、アストロサイトのHIF-1 α が虚血耐性獲得に重要であるかは不明であった。今回、初代培養細胞を用いた*in vitro*実験とMCAOモデルを用いた*in vivo*実験の検討により、神経細胞とアストロサイトでHIF-1 α の発現メカニズムに違いがあることを見出し、この違いがアストロサイトHIF-1 α の重要性を説明する上で鍵となることを明らかにした。低酸素時、酸素依存的にHIF-1 α を分解する酵素PHD2の阻害によりHIF-1 α は蓄積し、さまざまな神経保護分子の産生が誘導されることが知られている。神経細胞のHIF-1 α はこのメカニズムを介して発現するのに対し、アストロサイトのHIF-1 α 発現は低酸素非依存的であり、その代わりにP2X7受容体に依存的であった。また、PHD2の発現レベルは、神経細胞と比較し、アストロサイトでは顕著に低かった。さらに、低酸素により誘導される神経細胞HIF-1 α の発現亢進は一過性であるのに対し、P2X7受容体活性化によるアストロサイトHIF-1 α の発現亢進は持続的であった。これらの結果から、アストロサイトHIF-1 α はPHD2による分解を受けないため、発現が持続することが考えられた。以上のことから、アストロサイト性脳虚血耐性は、P2X7受容体を介する持続的なHIF-1 α 発現亢進により、神経保護効果を誘導することが示唆された。

転写因子低酸素誘導因子-1 α によるヒト EP4 受容体発現制御機構の 解明

○清良尚史¹, 藤野裕道², 大竹翔¹, John W. Regan³, 村山俊彦¹

¹千葉大院・薬、²徳島大院・医歯薬、³アリゾナ大・薬

【目的】ヒト結腸癌細胞株 HCA-7 細胞を用いた検討より、Prostaglandin E₂ をリガンドとする EP4 受容体が、主に Gi 型 G タンパク質経路を活性化することで結腸癌増悪に寄与する可能性を当研究グループは報告している。また HCA-7 細胞の EP4 受容体発現は、転写因子低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) 依存的に抑制されることも報告している。本研究では、HIF-1 α による EP4 受容体転写制御機構の詳細の解明を目的とし、検討を行った。

【方法】ヒト EP4 受容体プロモーター配列の転写因子結合サイト検索を行った。また HCA-7 細胞において、野生型ヒト EP4 受容体プロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子 (EP4 WT) やコントロールベクター (vec) をトランスフェクトし、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により HIF-1 α が EP4 受容体プロモーター領域に直接結合するかどうかの検討を行った。

【結果及び考察】ヒト EP4 受容体プロモーター配列に HIF-1 α が結合することが知られている低酸素応答性領域 (HRE) の存在を同定した。また ChIP 法より、EP4 WT 由来の EP4 受容体プロモーター配列を検出した。さらに vec をトランスフェクトしたサンプルにおいて、HCA-7 細胞由来の EP4 受容体プロモーター配列を検出した。EP4 WT 上の HRE 配列に変異導入したレポーター遺伝子 (EP4 mut) を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。しかしながら、EP4 mut では、HIF-1 α 依存的な EP4 受容体転写活性減少の回復は見られなかった。再度 EP4 受容体プロモーター配列の検索を行った所、HRE 配列とは1塩基だけ異なる配列が複数存在していることが明らかとなった。以上の結果から、HIF-1 α は、ヒト EP4 受容体プロモーター領域に直接結合するが、HRE 配列1カ所だけで転写制御されているだけでなく HRE 配列と類似した配列にも結合することで EP4 受容体発現レベルを制御している可能性があることが示唆された。今後、HIF-1 α が HRE 類似配列のどの部分に結合しているのかを ChIP-qPCR を用いて明らかにしたいと考えている。

オキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛モデルにおける種差の検討 ②

○志田原由華^{1,2}、中村まり¹、Aldric Hama¹、鈴木純子¹、松田明久¹、高松宏幸¹、
間賀田泰寛²

¹株式会社浜松ファーマリサーチ ²浜松医科大学 光先端医学教育研究センター フォトニクス
医学研究部 分子病態イメージング研究室

オキサリプラチンは大腸がんの治療に広く用いられる白金系抗がん剤である。オキサリプラチンは投与直後から数時間以内に寒冷刺激で誘発・増強される急性の末梢神経障害 (cold allodynia) がほぼ全例において発症することが知られている。しかしながら現在のところ有効な予防法や対処法は確立されていないため、临床上大きな問題となっている。本研究では、遺伝学的・解剖学的にヒトに近いカニクイザルに着目し、カニクイザルを用いたオキサリプラチン誘発急性末梢神経障害性疼痛モデルの開発を行った。また既存のラットを用いたオキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛モデルとの比較を行った。覚醒下のカニクイザルにオキサリプラチン (5 mg/kg) を2時間かけて静脈内投与した。オキサリプラチンは2週間に1回、計3回投与を行った。寒冷刺激の評価として tail immersion test を行った結果、オキサリプラチン単回投与3日後に全例で cold allodynia を発症した。オキサリプラチン投与3日後に疼痛の治療で用いられる既存薬の薬効評価を行ったところ、duloxetine (30 mg/kg, p. o.) では有意な cold allodynia の改善が認められたが、pregabalin (30 mg/kg, p. o.) 及び tramadol (30 mg/kg, p. o.) では cold allodynia の改善は認められなかった。一方、ラットにオキサリプラチン (5 mg/kg) を2日間腹腔内投与した。寒冷刺激の評価として acetone test を行った結果、オキサリプラチン投与3日後では cold allodynia の発症が観察されなかった。そのためさらに2週間オキサリプラチンの投与を行った結果、オキサリプラチン投与16日後に約65%のラットで cold allodynia の発症が観察された。Cold allodynia の発症が認められたラットを用いて薬効評価を行ったところ、duloxetine (30 mg/kg, p. o.)、pregabalin (30 mg/kg, p. o.) 及び tramadol (30 mg/kg, p. o.) のいずれの薬剤についても有意な cold allodynia の改善が認められた。以上の結果から、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害性疼痛モデルにおいて、cold allodynia の発症率や薬剤に対する反応に種差が認められ、カニクイザルはよりヒトの病態に近いモデルであることが示唆された。次に、それぞれの動物モデルにおいて DRG に器質的変化が認められるかどうかを調べるため、病理組織学的検査を行った。その結果、カニクイザルではわずかではあるが神経細胞の変性が認められた。一方、ラットでは神経細胞の変性は認められず、細胞が小型化している傾向が認められ、DRG における組織学的変化についても種差があることが明らかとなった。